

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-98771

(43) 公開日 平成9年(1997)4月15日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N	1/02		C 1 2 N	1/02
	1/00			1/00
				T
				F

審査請求 未請求 請求項の数6 F D (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平7-284336

(22) 出願日 平成7年(1995)10月6日

(71) 出願人 000000099  
石川島播磨重工業株式会社  
東京都千代田区大手町2丁目2番1号

(72) 発明者 田仲 さと子  
神奈川県横浜市磯子区新中原町1番地 石  
川島播磨重工業株式会社技術研究所内

(72) 発明者 内山 茂  
神奈川県横浜市磯子区新中原町1番地 石  
川島播磨重工業株式会社技術研究所内

(72) 発明者 鬼山 和彦  
神奈川県横浜市磯子区新中原町1番地 石  
川島播磨重工業株式会社技術研究所内

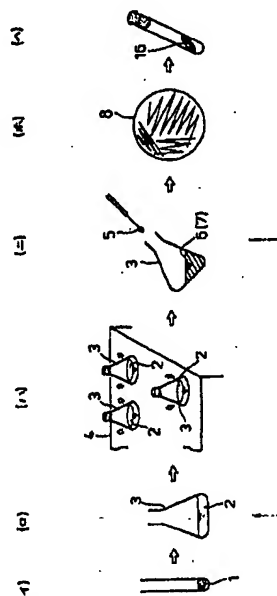
(74) 代理人 弁理士 坂本 光雄

(54) 【発明の名称】 石油分解微生物のスクリーニング用培地及びこれを用いた石油分解微生物のスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 試料中より石油分解微生物を容易に分離できるようにする。

【解決手段】 炭素源にケロシンを用いると共に窒素源に硫酸アンモニウムを用いたスクリーニング用培地2を形成する。該スクリーニング用培地2を用いて試料1中の石油分解微生物を集積培養させるようにする。スクリーニング用培地2中には炭素源としてケロシンのみが含まれているだけなので、石油系物質を資化できない微生物の生育を抑えて石油分解微生物のみを選択的に増殖させることができる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 炭素源にケロシン、窒素源に硫酸アンモニウムを用い、且つ界面活性剤を含有させてなることを特徴とする石油分解微生物のスクリーニング用培地。

【請求項2】 ケロシンの含有量が1%、硫酸アンモニウムの含有量が0.5%、界面活性剤の含有量が0.5%である請求項1記載の石油分解微生物のスクリーニング用培地。

【請求項3】 炭素源にケロシン、窒素源に硫酸アンモニウムを用い且つ界面活性剤を含有させてなるスクリーニング用培地に試料を接種して振盪させて試料中の石油分解微生物を集積培養し、次いでこの培養液の適量を別の新しい上記と同様なスクリーニング用培地に移して培養を行い、石油分解微生物を増殖させてスクリーニングすることを特徴とする石油分解微生物のスクリーニング方法。

【請求項4】 試料をスクリーニング用培地を用いて30℃、180rpmで回転振盪培養を3～4日行う請求項3記載の石油分解微生物のスクリーニング方法。

【請求項5】 スクリーニング後に、選り出した石油分解微生物を、該スクリーニングと同様のスクリーニング用培地を用いて振盪培養してスクリーニングする請求項3記載の石油分解微生物のスクリーニング方法。

【請求項6】 選り出した石油分解微生物をスクリーニング用培地を用いて30℃、180rpmで2日間回転振盪培養を行う請求項5記載の石油分解微生物のスクリーニング方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は微生物による含油廃水処理に利用するための石油分解微生物のスクリーニング用培地及びこれを用いた石油分解微生物のスクリーニング方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】タンカーの衝突、座礁等の事故による石油の海洋への流出や、自動車製造業、石油精製工業、潤滑油再生工場等から発生する含油廃水による石油の流出、等により海洋汚染の問題を引き起こしている。

【0003】従来、上記海洋に流出した石油や含油廃水中の石油系物質を除去させて海水を浄化し、海洋汚染の問題を解消すべく種々の研究が重ねられ、これまでに膜分離法や燃焼法が用いられて来た。

【0004】しかし、これらの方法は、いずれもランニングコストが高くなると共にメンテナンスも大変で手間がかかるという問題を有している。

【0005】そのため、近年、低コストで且つメンテナンスの容易な処理方法として、微生物を用いて処理するための研究が進められている。すなわち、海洋中には石油中の炭化水素を炭素源として増殖し得る海洋微生物が数多く存在していることが知られており、又、自然界に

は多種多様な微生物が生息していて、その中には石油分解能の高い菌（バクテリア）が存在していることも予想されることから、これらを用いて海洋の石油汚染を浄化したり、含油廃水処理するための研究が盛んに行われており、微生物を培養して、目的とする石油分解能の高い微生物を探索することが行われている。

【0006】詳述すると、細菌（バクテリア）を培養する場合に、従来一般の細菌用培地として用いられているものには、

## ①ブイヨン（肉汁）培地

肉エキス	10g
ペプトン	10g
NaCl	5g
蒸留水	1000ml

## ②ペプトン水

ペプトン	10g
NaCl	5～10g
蒸留水	1000ml

## ③ハート インヒュージョン培地

（牛心臓浸出液 臓器500g相当量）	
ペプトン	10g
NaCl	5g
蒸留水	1000ml

等があるが、これらの培地で生育した微生物中から石油分解能の高い微生物を分離して海洋汚染の浄化や含油廃水の処理に用いるようにしている。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】ところが、上記従来用いられている培地に有機質窒素源が含まれると細菌（バクテリア）が良好な生育を示すことから、培地には有機質窒素源が含まれ、この有機質窒素源を炭素源としても微生物が利用可能であるため、培地中の炭素源として石油系物質を用いてもこれを資化できない微生物もペプトンを効率よく資化して生育し、石油を分解しなくても生育度が高い値を示すものがあり、必ずしも石油分解能の高い微生物が集積されるとは限らず、収集した試料から目的とする微生物のみを単独で分離することが難しく、石油分解能の高い微生物を簡単に探索する方法が見い出されていない。

【0008】そこで、本発明は、集積培養により石油分解微生物を選択的に増殖させて微生物濃度を増大させることにより、石油分解微生物を容易に分離することができるようにした石油分解微生物のスクリーニング用培地及びこれを用いた石油分解微生物のスクリーニング方法を提供しようとするものである。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記課題を解決するために、ケロシンを炭素源とし、硫酸アンモニウムを窒素源として用い、且つ界面活性剤を含有させてなるスクリーニング用培地とし、又、ケロシンの含有量を

10

20

30

40

50

1%、硫酸アンモニウムの含有量を0.5%、界面活性剤の含有量を0.5%としたスクリーニング用培地とする。

【0010】この培地で生育する微生物は石油分解能の高い微生物ということになり、スクリーニングが容易となる。

【0011】更に、上記スクリーニング用培地を用いて試料中に含まれる石油分解微生物を集積培養し、次いで該石油分解微生物をスクリーニングして他の微生物より分離するようにする。

【0012】微生物が生育するためには炭素源と窒素源が必要であるが、ケロシンの如き石油系物質を炭素源として用いると共に硫酸アンモニウムの如き無機類窒素源を用いたことにより、培地中に存在する炭素源は石油系物質のみとなることから、石油系物質を資化できる微生物のみが生育可能となって他の微生物の生育が抑制され、石油分解微生物を選択的に培養させることができる。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態を図面を参照して説明する。

【0014】図1乃至図3は本発明の石油分解微生物のスクリーニング用培地とこの培地を用いたスクリーニング方法の実施の一形態を示すもので、石油系物質を炭素源とし且つ無機類を窒素源としてなるスクリーニング用培地を用い、集積培養により石油資化能に優れた微生物、すなわち、石油分解微生物のみを選択的に増殖させるようにする。

【0015】上記炭素源としての石油系物質には、最も一般的であるケロシン（灯油）を用いるようにするとよく、該ケロシンのスクリーニング用培地中の濃度は10.0g/l（1%）程度とする。又、ケロシンの如き石油系物質はそのままの状態では培地を希釈するための蒸留水中に溶解されないことから、たとえばツウイーン（Tween）20の如き界面活性剤を乳化剤として使用してケロシンを乳化させるようにし、この際、乳化剤の添加量により蒸留水中にケロシンを全て溶解させたり一部残った状態にさせたりすることができるので、これを適宜調節してスクリーニングに最適な培地条件を形成するようにするとよい。

【0016】上記無機類窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムなどのアミノ態窒素が含まれないものを用いるようにし、特に、硫酸アンモニウムを用いる場合にはスクリーニング用培地中の濃度は5.0g/l（0.5%）程度とする。

【0017】又、上記スクリーニング用培地には、ビタミン源を加えることもでき、例えば、ビオチンを0~0.01mg/l、塩酸チアミンを0~0.2mg/l程度加えるようにしてもよく、これにより、ビタミン要求性

を有する石油分解微生物のスクリーニングも可能となる。

【0018】更に、上記スクリーニング用培地には、真菌類の培養における微量成分となる無機塩類を加えるようにしてもよく、例えば、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ を1.0g/l程度、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を0.4g/l程度、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を0.01g/l程度、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を2mg/l程度、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を2mg/l程度、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を2mg/l程度加えることができる。

【0019】更に又、上記スクリーニング用培地はpH7.0程度の中性であることが望ましく、pH調整方法としては、上記培地成分を蒸留水に溶解させた後に1.0N-NaOH等の無機塩基を滴定して調整するようにする。

【0020】なお、上記スクリーニング用培地は、液体培地として三角フラスコの如き滅菌容器に注入して使用したり、あるいは固体培地としてペトリ皿等に入れて使用することもできる。

【0021】今、石油分解微生物を含むと思われる試料1（図1（イ））より石油分解微生物のみをスクリーニングしようとする場合、まず、上記の如き組成とした液体のスクリーニング用培地2を所要量入れた滅菌容器としての三角フラスコ3中に上記試料1を適量添加し（図1（ロ））、該三角フラスコ3を振盪機4に載せて回転振盪培養や往復振盪培養等の好気的条件下で培養させるようにする（図1（ハ））。なお、培養温度は20~40℃程度とし、特に30℃前後が最適である。

【0022】次いで、石油資化性菌株を充分に増殖させるため、図1に一点鎖線で示すように、培地が白濁（赤色又は黄色を呈することもある）して微生物の生育が明らかに認められるようになると（図1（ニ））、滅菌した白金耳5を用いて三角フラスコ内の白濁した培養液6の一部を新鮮なスクリーニング用培地2へ無菌的に移植した後（図1（ロ））、振盪機4を用いて上記培養条件で再度回転振盪培養や往復振盪培養させるようにし（図1（ハ））、この移植及び培養操作を微生物の増殖状態に応じて数回程度（通常、2~3回）繰り返すようにする。

【0023】次に、微生物を充分に増殖させた最終培養液7から1白金耳量を採取して上記組成のスクリーニング用培地からなる平板培地8上に希釈播種させ（図1（ホ））、最終培養液7を希釈播種した平板培地8を、30℃で5~7日間培養させるようにする。この際、最終培養液7の平板培地8上への希釈播種の手順は、図2に示す如く、まず、滅菌した白金耳5を用いて上記最終培養液7を平板培地8の縁部9付近上に播種し、この播種線10の一箇所11から、滅菌した白金耳5により別の播種線12を引き出すようにした後、同様にして播種線12の1箇所13から更に播種線14を引き出すよう

にするとよい。

【0024】続いて、微生物の増殖が進んで塊状となり、平板培地8上に単一のコロニー15が出現すると(図3(イ))、図1(ハ)又は図3(ロ)に示すように、生じた各コロニー15を分離して斜面培地16へ移植して保存させるようにする。

【0025】上記において、石油資化性菌株のみを増殖させて石油分解微生物のスクリーニングの選択性を向上させるためには、培地に添加する炭素源をケロシンの如き石油系物質のみとすることが望まれるが、本発明では窒素源として硫酸アンモニウムの如き無機類窒素源を用いるようにしてあることから、従来において用いられていたブイヨン(肉汁培地)、ペプトン水、又はハートインフュージョン(Heart infusion)培地のように微生物が窒素源に含まれる有機質を炭素源として利用することを防止することができ、石油系物質を炭素源として質化する能力に優れた微生物(石油分解微生物)を選択的に増殖させ、容易に分離することができる。

【0026】

【実施例】次に、本発明の実施例を図4に示すフロー図に基づいて詳述する。

#### \* (1) 分離源の選定

首都圏を流れる複数の河川の河口付近の海水や底泥等の石油系物質が集積していると予想される16個所の異なる場所より試料を採集し、これを集積培養のための分離源とした。

#### (2) スクリーニング用培地の生成

石油分解微生物を分離するために、下記表1に示すような組成のスクリーニング用培地を生成する。この際、表1の各組成を、各々表示された量を秤量して( $\text{NH}_4$ ) $2\text{SO}_4$ から順々に連続攪拌させた状態の蒸留水1000ml中へ投入して溶解させるようにし、次いで、この培地に超音波処理を施しながらケロシン10gを少量ずつ添加して完全に溶解させた後、1.0N-NaOHを滴定して培地をpH7.0に調整し、これを100ml容三角フラスコに30mlずつ分注してオートクレーブにより121℃、15分間の滅菌処理を施し、自然冷却後、実験に供するようにした。なお、表1においてツウイーン(Tween)20はケロシンを乳化させて蒸留水中に溶解させるための界面活性剤である。

20 【0027】

【表1】

表1 石油分解微生物のスクリーニング用培地

ケロシン(灯油)	10	g
( $\text{NH}_4$ ) $2\text{SO}_4$	5.0	g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.0	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4	g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.002	g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.002	g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.002	g
ビオチン	0.01	mg
塩酸チアミン	0.2	mg
ツウイーン(Tween)20	5.0	g
NaCl	30	g
蒸留水	1000ml	
pH7.0 (adjusted by 1.0N-NaOH)		

#### (3) 海水、底泥等による集積培養(1次スクリーニング)

上記異なる場所より採取した試料を、100ml容三角フラスコに分注された液体のスクリーニング用培地に別々に接種し、30℃、180rpmで回転振盪培養を3~4日行い(第1培養)、スクリーニング用培地が微生物の増殖により白濁(赤又は黄等に呈色することもある)した後、この第1培養液から1白金耳量を、新しいスクリーニング用培地を注入した三角フラスコへ移植して、30℃、180rpmにて再び3~4日間回転振盪培養を行い(第2培養)、この培地が再び白濁してきたら新

しいスクリーニング用培地を注入した三角フラスコへ再度移植するようにし、この操作を2~3回繰り返した後、得られた最終培養液を、図2に示すような手順により平板培地上へ画線状に希釈播種した。しかる後、この平板培地を、コロニーが出現するまで30℃で5~7日程度培養した。生じたコロニーは単一の細胞によって生成されたものとし、これを純粋な菌株として拾い上げて斜面培地上へ植菌して石油分解微生物として保存した(表2)。

【0028】なお、保存した16菌株のうち、目視による判断により、特にスラント上で生育の良好な9菌株

(BS-1、DS-1、ES-1、FS-1、JS-1、LS-1、NS-1、OS-1)を選抜し、これらを2次スクリーニングへ供した。 \* 【0029】  
【表2】

表2 集積培養により得られた分離菌株

NO.	菌 株
1	AS-1
2	BS-1
3	CS-1
4	DS-1
5	ES-1
6	FS-1
7	GS-1
8	HS-1
9	HS-2
10	IS-1
11	JS-1
12	KS-1
13	LS-1
14	MS-1
15	NA-1
16	OS-1

(4) 石油培地での生育度による優良菌株の選抜（2次スクリーニング）  
1次スクリーニングにて選出された9菌株について、1次スクリーニングと同様のスクリーニング用培地を用い、30℃、180rpmで2日間の回転振盪培養を実施した後、分光光度計を用いて、各培養液の610nmにおける吸光度を測定して各菌株の生育度を測定し、特に※

※生育状態の優れた3菌株（JS-1、KS-1、LS-1）を選抜した（表3）。ここで、吸光度1.0はこれらの菌株においても菌体乾燥重量約0.1mg/mlに相当し、供試菌株のLS-1株では菌体重量0.0954mg/mlに相当した。  
【0030】  
【表3】

表3 石油培地中における分離菌株の生育度

菌 株	生育度 (OD <sub>610nm</sub> )
BS-1	2.07
DS-1	2.00
ES-1	1.74
FS-1	1.83
JS-1	2.97
KS-1	2.41
LS-1	2.80
NS-1	2.03
OS-1	1.73

(5) 石油資化能の最も高い菌株の選定

1次スクリーニング、2次スクリーニングを経て得られた、石油培地中において生育が優良であった3菌株を、引き続き様々な培地条件下にて培養することにより、石

油資化能の最も高い菌株を選定することができる。培地条件については、例えば、集積培地の初発pH、培養温度、ケロシン濃度、界面活性剤（Tween 20）濃度、培地中の炭素源と窒素源との比（C/N比）等が挙

げられる。

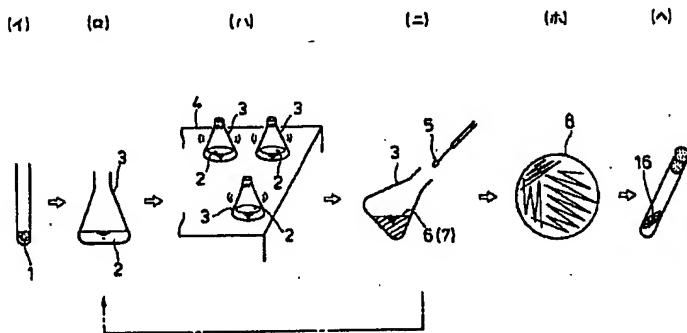
【0031】なお、本実験に引き続いて行われた研究により、選抜されたJS-1、KS-1、LS-1の3菌株のうちLS-1が最も石油酸化能が高い、つまり、石油分解能が最も優れていることが確認された。

【0032】

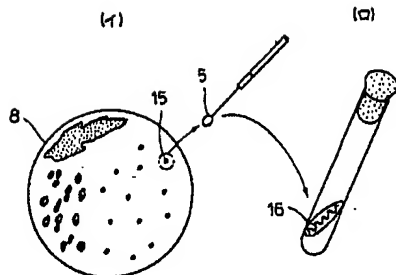
【発明の効果】以上述べた如く、本発明の石油分解微生物のスクリーニング用培地及びこれを用いた石油分解微生物のスクリーニング方法によれば、ケロシンの如き石油系物質からなる炭素源と硫酸アンモニウムの如き無機類窒素源とからなるスクリーニング用培地を用いているので、この培地中で生育する微生物は石油分解能の高い微生物であることがわかり、探索が容易となる。又、かかるスクリーニング用培地を用いて試料中に含まれる石油分解微生物を集積培養し、次いで該石油分解微生物をスクリーニングするようにしてあることから、石油系物質を質化することができない微生物の生育を抑えて石油系物質を質化する能力に優れている石油分解微生物を選択的に増殖させることができ、石油分解微生物の選択性を大幅に向上させて石油分解微生物を容易に分離することができる、という優れた効果を発揮する。

【図面の簡単な説明】

【図1】



【図3】



【図1】本発明の実施の一形態において、全体の流れについて示すもので、(イ)は採集した試料を示す概要図、(ロ)は三角フラスコ内へスクリーニング用培地を注入した状態を示す概要図、(ハ)はスクリーニング用培地を回転振盪培養している状態を示す概要図、(ニ)は石油分解微生物が増殖されて培養液が白濁した状態を示す概要図、(ホ)は平板培地を示す概要図、(ヘ)は斜面培地を示す概要図である。

【図2】石油分解微生物が十分に増殖された培養液を平板培地へ希釈播種する手順を示す説明図である。

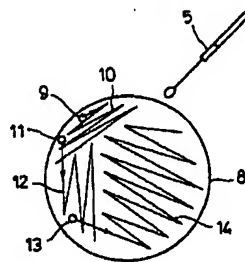
【図3】分離された石油分解微生物について示すもので、(イ)は平板培地上に石油分解微生物の単一コロニーが出現した状態を示す概略図、(ロ)は斜面培地を示す概略図である。

【図4】本発明の実施例の概要を示すフロー図である。

【符号の説明】

- 1 試料
- 2 スクリーニング用培地
- 3 三角フラスコ
- 4 振盪機
- 5 白金耳

【図2】



【図4】

